doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.011

一种检测马尔尼菲青霉菌实时荧光定量 PCR 方法的建立和应用 *

钟华敏 谢永强 邓秋连 黄莲芬 钟玉葵

(广州市妇女儿童医疗中心检验科 广东 广州 510120)

摘要 目的:建立一种检测马尔尼菲青霉菌的实时荧光定量 PCR 的方法。**方法:**针对马尔尼菲青霉菌 5.8S rRNA 设计特异性 PCR 引物,采用核酸荧光染料 SYBR GreenⅠ进行实时荧光定量 PCR 检测,探讨该方法的灵敏度和特异性,并进行临床样品检测验证。**结果:**该方法的特异性较好,与该菌属内的其他细菌间无交叉反应;灵敏度可检测出 10 个细胞 /mL 全血,在检测范围内线性良好,相关系数 R^2=0.981。临床样品检测和传统的培养方法结果完全相符。**结论:**该方法特异性好,灵敏度高,操作简单,检测时间短;临床样品检测具有很好的准确性,从本研究的结果显示实时荧光定量 PCR 方法在检测马尔尼菲青霉菌中的应用可以大大缩短临床的诊断时间,提高临床诊断的准确度和效率。

关键词:马尔尼菲青霉菌;实时荧光定量 PCR;荧光染料

中图分类号:Q93-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1247-03

Development and Application of a Quantitative Real-Time PCR Assay for Detection of Penicillium Marneffei*

ZHONG Hua-min, XIE Yong-qiang, DENG Qiu-lian, HUANG Lian-fen, ZHONG Yu-kui

(GuangZhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong, 510120, China)

ABSTRACT Objective: To develop a quantitative Real-Time PCR assay for detection of penicillium marneffei. **Methods:** A pair of PCR primers of penicillium marneffei 5.8S rRNA was designed, and Real-Time PCR assay with SYBR GreenⅠfluorescent dye was performed. Specificity and sensitivity of the assay were verified. The accuracy of the assay was verified, and clinic samples were detected with the PCR assay. **Results:** The PCR assay was specific to penicillium marneffei, and it had not cross-react with other strains of this Genus. Its detection sensitivity reached 10 cells per ml of blood. It had good linearity in the detection range, and R2 is 0.981. The results of detecting clinic samples were consistent with that of traditional culture method. **Conclusions:** The quantitative Real-Time PCR assay has good specificity and sensitivity. The method is easy manipulation and quick. The good accuracy of the assay was shown in detecting clinic samples. The clinic application of the quantitative Real-Time PCR can accelerate the diagnosis of penicilliosis mamefei, and improve the diagnostic accuracy and efficiency.

Key words: Penicillium marneffei; Real-Time PCR; Fluorescent dye

Chinese Library Classification(CLC): Q93-33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1247-03

前言

马尔尼菲青霉菌(penicillium marneffei,PM)是由 Capponi 等 1956 年在越南巴斯德研究所工作时首先从越南野生中华竹鼠肝脏分离出并命名,是青霉属中唯一的温度双向型真菌,在 25℃～28℃条件下生长特征是菌丝相,37℃条件下生长是酵母相,两者能相互转化。它可引起人类播散性和进行感染,即马尔尼菲青霉菌病(penicilliosis marneffei,PSM)[1],在中国南方及越南、泰国等东南亚国家和地区呈区域性流行[2-4]。PSM 由于临床症状常无特异性,起病隐匿,故常容易被误诊和漏诊,以致死亡率很高[5,6],因而早诊断早治疗具有重要的临床意义。近年来由于 HIV 母婴传播的几率增加以及抗生素、免疫抑制剂和创伤性诊疗技术等临床的大量应用,儿童马尔尼菲青霉菌感染显著增加[7,8],严重地威胁着患儿的身心健康。本文拟建立一种采用核酸荧光染料 SYBR GreenⅠ的实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌。

1 材料和方法

1.1 临床标本的收集

标本取自 2010 年 1 月至 2012 年 12 月于我院住院 12 例疑似马尔尼菲青霉菌感染的患儿血液 5～10 mL、骨髓 2～3 mL 接种于与 BACTEC9120 快速血培养仪配套的 BD 树脂培养瓶进行增菌培养。

1.2 马尔尼菲青霉菌的培养

* 基金项目:广州市医药卫生科技项目(201102A213023)

作者简介:钟华敏(1978-),女,副主任技师,硕士研究生,主要从事微生物检验方面的工作,

E-mail:huamin_zhong@hotmail.com

(收稿日期:2013-08-10 接受日期:2013-09-05)

选取培养阳性并鉴定为 PM 的菌株转种于沙保弱琼脂培养基上，分别置于 25℃ 和 37℃ 孵育，观察两种温度下菌落形态、产色素情况，并取部分菌落置于显微镜下观察孢子和菌丝形态。

1.3 DNA 提取

DNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司酵母基因组提取试剂盒(DP307)，操作按试剂盒说明进行，纯培养物、外周血样品或血培养物同样按说明进行。DNA 样品最后都用 NanoDrop 进行质量鉴定和浓度测定。

1.4 引物设计和序列

特异的 PCR 引物针对马尔尼菲青霉 5.8S rRNA(GenBank: L37406.1)，采用 Primer Premier 5.0 设计，设计好的引物序列再采用 BLAST 程序进行了检索比对，序列见表 1。

表 1 马尔尼菲青霉 5.8S rRNA 引物序列

Table 1 Marneffei Penicillium 5.8S rRNA primer sequences

Name	Primer sequence(5'-3')	Position	Position
Sense primer	CCTGTCCGAGCGTCATTTCT	359-378	93bp
Anti-sense primer	TCCGAGGTCAACCGTGGTAA	522-541	

1.5 实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌的灵敏度

马尔尼菲青霉菌的酵母细胞用细胞计数板计数，其 10^5/mL 个细胞加入 1 mL正常人全血中，然后稀释到 10^4 个细胞 /mL、10^3 个细胞 /mL、10^2 个细胞 /mL、10^1 个细胞 /mL和 1 个细胞 /mL。按照前面的 DNA 提取程序提取 DNA，每份样品单独提取 2 份 DNA。

1.6 SYBR Green Ⅰ 实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌 5.8S rRNA

采用 Roche LightCycler 定量 PCR 仪进行检测，试剂采用 FastStart DNA Master SYBR Green Ⅰ 试剂盒，反应体系如下：10× 酶混合物 2 μL，$MgCl_2$ 1.6 μL，PCR 引物(10 μM)各 0.75 μL，DNA 模板 5 μL，无菌水 9.9 μL。Roche LightCycler 定量 PCR 仪反应条件为：95℃ 10min；95℃ 30sec，55℃ 30sec，72℃ 30sec，40 个循环。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌的特异性

为了检测此实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌的特异性，本研究将菌丝相和酵母相马尔尼菲青霉菌以及其它相近的菌属白色念珠菌、黄曲霉菌、青霉菌，进行纯培养后提取 DNA，都取 50 ng DNA 采用此荧光定量 PCR 体系进行检测，最后只有菌丝相和酵母相马尔尼菲青霉菌被检测了出来(酵母相 Ct 值 15.22，菌丝相 Ct 值 19.79)，其它几种菌属都没被检测出。

2.2 实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌的灵敏度

马尔尼菲青霉菌的实时荧光定量 PCR 检测体系可以检测到 10 个细胞 /mL 全血(如图 1)，在检测范围(全血中酵母细胞浓度为为 10^5 个细胞 /mL、10^4 个细胞 /mL、10^3 个细胞 /mL、10^2 个细胞 /mL 和 10^1 个细胞 /mL)呈良好的线性，相关系数 R^2=0.981(如图 2)。

2.3 临床样品的检测

共收集了 12 个临床样品进行了血培养和实时荧光定量 PCR 检测，所有临床样品都在抗真菌治疗之前采集。12 例样品中 10 例 PCR 检测阳性，常规培养也为阳性，结果完全一致；其中 10 例阳性（5 例样品培养前 PCR 检测阳性，1 周后培养阳性；5 例样品培养前 PCR 检测阴性，培养 1 周后 PCR 检测全部被阳性，2 周后培养阳性，其中 2 例培养弱阳性）。2 例阴性。

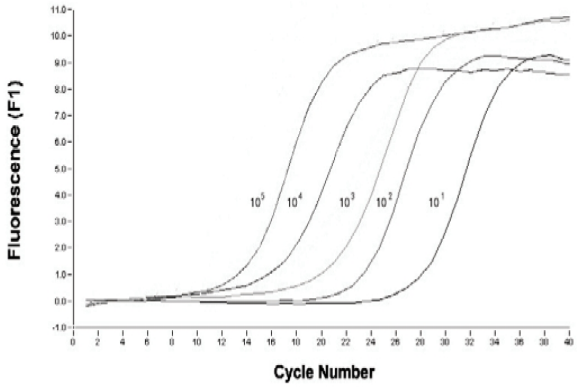

图 1 实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌的灵敏度

Fig.1 Real-time fluorescence quantitative PCR detection sensitivity of Penicillium marneffei

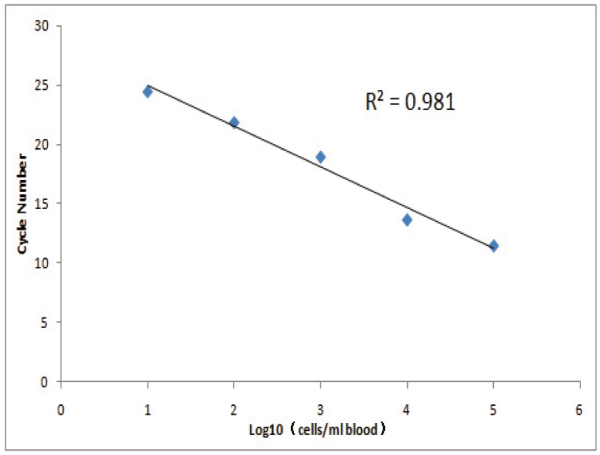

图 2 实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌线性回归分析

Fig.2 Real-time PCR detection of Penicillium marneffei linear regression analysis

3 讨论

本文建立了一种检测马尔尼菲青霉菌的实时荧光定量 PCR 的方法，该方法灵敏度高，特异性好，操作简单，检测时间短；临床样品检测具有很好的准确性。该检测体系采用 SYBR Green Ⅰ 荧光染料，未采用探针，方法简单并具有较好的兼容

性，结合实时荧光定量 PCR 溶解曲线有可能与其他病原体检测体系整合为多重检测体系。以往常规的方法是发现早期进行血液或者骨髓培养，是检测马尔尼菲青霉菌的有效方法，培养阳性可以作为 PSM 的诊断依据。但步骤繁琐且培养时间较长，需数天才能得到实验结果[9-11]。从分子水平来检测微生物是微生物检测的发展的趋势。以微生物的核酸作为检测靶标的方法可以克服以微生物表型特征为基础检测方法的缺点和影响因素，从根本上对微生物进行鉴定和特征分型，大大缩短了检测时间，提高检测的灵敏度和特异性[12-14]。近年来，几种 PCR 检测马尔尼菲青霉菌的方法已经建立了起来，这些方法是基于马尔尼菲青霉菌的 ITS 和 5.8S rRNA 基因（ITS1-5.8S-ITS2）。一种巢式 PCR 先用真菌通用引物（ITS5 和 ITS4）扩增 ITS 区，然后再用马尔尼菲青霉菌特异引物扩增马尔尼菲青霉菌特异性的核酸片段，灵敏度达 1.8 fg/μL [15]。一种 PCR-EIA 也先用真菌通用引物扩增出真菌 rDNA 保守区，然后用特异的探针鉴定检测各种真菌，马尔尼菲青霉菌与其它真菌没有发现交叉反应，该方法能从纯培养中快速检测出马尔尼菲青霉菌[16-18]。这些 PCR 方法灵敏度高，但不能对样品进行定量检测，检测结果需要通过 PCR 产物电泳后才能判定，步骤繁琐，结果不直观。最近，一种用 TaqMam 探针技术的实时荧光定量 PCR 技术已用来定量检测马尔尼菲青霉菌，此方法采用特异的 PCR 引物和 TaqMam 探针扩增马尔尼菲青霉菌 5.8S rRNA，检测灵敏度高，包含有 10 个马尔尼菲青霉菌细胞的样品即可被检出，既能应用于外周血样品也能检测血培养样品，且实验结果直接可以从实时定量荧光 PCR 仪上得到，不需要 PCR 产物电泳，是一种检测马尔尼菲青霉菌快速而准确的方法[19,20]。TaqMam 探针技术具有特异性好的优点，但针对每一个检测的靶分子都需要设计相应的 TaqMam 探针，缺乏通用性[21]；而通用的核酸荧光染料 SYB-R Green Ⅰ可以替代它，这样检测过程中可以通过 PCR 产物的溶解曲线判定检测的结果，同时也可能使马尔尼菲青霉菌的实时荧光定量 PCR 检测体系和其它致病菌的 PCR 体系整合成一个体系，实现可以同时检测多种致病菌的多重荧光定量 PCR 体系。

本研究用实时荧光定量 PCR 的方法检测 12 个临床样品时，10 例阳性和 2 例阴性，与培养结果完全一致。其中有 5 例样品在培养前就可以被实时荧光定量 PCR 检测出来，说明了 PCR 方法具有很高的灵敏度，样品不需要培养就可以被直接检测出来，而培养一周后才阳性，这大大地缩短了检测和临床发报告的时间，有助于病人的诊断和治疗；另有 5 例临床样品，在培养之前实时荧光定量 PCR 未能检出，在培养一周后再用实时荧光定量 PCR 被检出，而培养 2 周后才显示阳性，其中 2 例培养后还呈弱阳性，该 5 例样品未培养而 PCR 未能检出，原因可能未培养血液未经过真菌繁殖阶段，导致样品中 PM 细胞数极少，低于 PCR 检测的灵敏度（10^1 个细胞 /ml），培养一周细胞增殖后就被 PCR 检测出来，而 2 周后常规培养才呈阳性或弱阳性，此时用实时荧光定量 PCR 检测马尔尼菲青霉菌也能缩短检测时间。

临床上采集的样品影响因素较多，且采集的样品中病原菌的数量差异很大。从本研究的结果显示实时荧光定量 PCR 和常规的培养的方法两者相辅相成，两者在临床上结合应用可以大大缩短临床的诊断时间，提高临床诊断的准确度和效率。

参考文献（References）

[1] Ustianowski AP, Sieu TP, Day JN. Penicillium marneffei infection in HIV[J]. Curr Opin Infect Dis, 2008, 21(1): 31-36

[2] Nguyen K, Taylor S, Wanger A, et al. A case of Penicillium marneffei in a US hospital[J]. J Am Acad Dermatol, 2006, 54(4): 730-732

[3] Filiotou A, Velegraki A, Giannaris M, et al. First case of Penicillium marneffei fungemia in Greece and stain susceptibility to five licensed systemic antifungal agents andposaconazole [J]. Am J Med Sci, 2006, 332(1): 43-45

[4] Yap FB, Thevarajah S, Asmah J. Penicillium marneffei infection in an African man[J]. Dermatol Online J, 2010, 16(7): 2-7

[5] Baradkar V, Kumar S, Kulkarni SD. Penicillium marneffei:the pathogen at our doorstep[J]. Indian J Venereol Leprol, 2009, 75(6): 619-620

[6] 李凌华, 唐小平, 蔡卫平. 101 例艾滋病合并马尔尼菲青霉病的临床研究[J]. 中国艾滋病性病, 2008, 14(1): 12-14
Li Ling-hua, Tang Xiao-ping, Cai Wei-ping. A clinical study on 101 AIDS casas complicated with penicilliosis marneffe [J]. Chin J AIDs STD, 2008,14(1): 12-14

[7] 邓力, 张美德, 曾强, 等. 儿童马尔尼菲青霉菌感染 2 例临床和病理分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2004, 19(4): 233-234
Deng Li, Zhang Mei-de, Zeng qiang, et al. Clinical and pathological analysis of Penicillium marneffei infection in children:report o two cases[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2004, 19(4): 233-234

[8] 张烈光, 刘晋新, 江松峰, 等. 儿童艾滋病合并播散性马尔尼菲病的 X 线和 CT 表现分析[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2009, 7(1): 27-29
Zhang Lie-guang, Liu Jin-xin, Jiang Song-feng, et al. The X-ray and C-T finding of Penicillium marneffei in children with AIDS [J]. Chinese of CT and MRI, 2009, 7(1): 27-29

[9] Wong KF. Marrow penicilliosis: a readily missed diagnosis [J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(2): 214-218

[10] Vanittanakom N, Vanittanakom P, Hay RJ. Rapid identification of Penicillium marneffei by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 1739-1742

[11] Pornprasert S, Praparattanapan J, Khamwan C, et al. Histoplasmosis and TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection and identification of Penicillium marneffei[J]. Mycoses, 2009, 69(2): 150-163

[12] Sampietro DA, Marin P, Iglesias J, et al. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic Fusarium species associated to cereal grains from Argentina[J]. Fungal Biol, 2010, 114(1): 74-81

[13] Reddy AK, Balne PK, Gaje K, et al. PCR for the diagnosis and species identification of microsporidia in patients with keratitis [J].Clin Microbiol Infect, 2011, 17(3): 476-478

[14] Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, et al. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of case and diagnosis[J]. J Travel Med, 2011, 18(1): 26-33

[15] LoBuglio KF, Taylor JW. Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus Penicillium marneffei [J]. Clin Microbiol, 1995, 33: 85-89

（下转第 1387 页）

性,能改变核小体的高级折叠结构,干扰组蛋白与 DNA 结合,暴露启动子序列的结合位点,使转录因子能与特异性启动子序列结合,从而激活基因转录。

CHD4 基因位于人类染色质 12p13,编码了 1973 个氨基酸,大约 210KDa 。敲低 CHD4 导致更多的细胞周期蛋白激酶下调,细胞阻滞在 G1 期,大量的染色质松驰暴露,基因组不稳定增加。CHD4 的缺失细胞自发性损伤增加,对外源性造成损伤更加敏感,细胞的生存率下降。这些表明 CHD4 在染色质重塑、DNA 损伤修复和基因组稳定性方面担任着重要的角色。

CHD4 作为染色质重塑复合物之一,参与 DNA 早期损伤修复,其 S1349 位点可被 ATM 磷酸化。ATM 与染色质重塑复合物在 DNA 损伤修复中扮演者重要的作用,二者与 CHD4 有着密切的联系,这为进一步研究 ATM 与染色质重塑复合物在 DNA 损伤修复中相互影响提供新的视角。CHD4 的研究不仅有助于进一步揭示染色质重塑复合物在 DNA 损伤修复中作用机制,而且也为肿瘤提供理论支持及新的靶蛋白。

参考文献(References)

[1] Urquhart AJ, Gatei M, Richard DJ, et al. ATM mediated phosphorylation of CHD4 contributes to genome maintenance[J]. Genome Integr, 2011, 2(1): 1-10

[2] Larsen DH, Poinsignon C, Gudjonsson T, et al. The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage[J]. J Cell Biol, 2010, 190 (5): 731-740

[3] Polo SE, Kaidi A, Baskcomb L, et al. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodeling factor CHD4[J]. EMBO, 2010, 29(18): 3130-3139

[4] Magdalena Murawska, Alexander Brehm. CHD chromatin remodelers and the transcription cycle[J]. Transcription, 2011, 2(6): 244-253

[5] Mansfield RE, Musselman CA, Kwan AH, et al. Plant homeodomain (PHD) fingers of CHD4 are histone H3-binding modules with preference for unmodified H3K4 and methylated H3K9 [J]. Biol.Chem., 2011, 286(13): 11779-11791

[6] Musselman, C. A, Mansfield, R. E, Garske, A. L. et al. Binding of the CHD4 PHD2 finger to histone H3 ismodulated by covalent modifications[J]. Biochem J, 2009, 423(2): 179-187

[7] Shi, X, Hong, T, Walter, K. L, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine4 methylation to active gene repression[J]. Nature, 2006, 442(7089): 96-99

[8] Musselman, C. A, Ramirez, J, Sims, J. M, et al. Bivalent recognition of nucleosomes by the tandem PHD fingers of the CHD4 ATPase is required for CHD4-mediated repression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(3): 787-792

[9] Flanagan, J. F, Mi, L. Z, Chruszcz, M, Cymborowski M, et al. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail [J]. Nature, 2005, 438(7071): 1181-1185

[10] Flanagan JF, Blus BJ, Kim D, et al. Molecular implications of evolutionary differences in CHD double chromodomains[J]. Biol, 2007, 369(2): 334-342

[11] Bouazoune K, Mitterweger A, Langst G, et al. The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization[J]. EMBO, 2002, 21(10):2430-2440

[12] Hauk G, McKnight N, Nodelman, et al. The chromodomains of the Chd1 chromatin remodeler regulate DNA access to the ATPase motor [J]. Cell, 2010, 39(5): 711-723

[13] Polo SE, Kaidi A, Baskcomb L, et al. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodeling factor CHD4[J]. EMBO, 2010, 29(18): 3130-3139

[14] Wagner E, Brehm A. Muscles and Tendons of a Nucleosome Remodeling Machine[J]. Mol.Biol, 2012, 422(1): 1-2

[15] Hirose F, Ohshima N, Kwon EJ, et al. Drosophila Mi-2 negatively regulates d DREF by inhibiting its DNA-binding activity[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(14): 5182-5193

[16] Polo SE, Backcomb L, Galanty Y, et al. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodeling factor CHD4[J]. EMBO, 2010, 29(18): 3130-3139

[17] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy[J]. Nature, 2005, 434(7035): 917-921

[18] Pegoraro G, Kubben N, Wickert U, et al. Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(10): 1261-1267

[19] Carter S, Vousden KH. Modifications of p53: competing for the lysines[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(1): 18-24

[20] Ramirez J, Dege C, Kutateladze TG, et al. MBD2 and multiple domains of CHD4 are required for transcripitonal repression by Mi-2/NURD complexs[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(24): 5078-5088

[21] Pan MR, Hsieh HJ, Dai H, et al. Chromodomain helicase DNA-binding protein4 (CHD4) regulates homologous recombintion DNA repair, and its deficiency sensitizes cells to poly (ADP-ribose) polymerase(PARP) inhibitor treatment[J]. Biol Chem, 2012, 287(9): 6764-6772

(上接第 1249 页)

[16] Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, et al. Rapid detection of Candida albicans in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 3293-3293

[17] Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10: 190-212

[18] Pongpom M, Sirisanthana T, Vanittanakom N. Application of nested PCR to detect Penicillium marneffei in serum samples[J]. Med Mycol, 2009, 47(5): 549-553

[19] Mekha N, Sugita T, Makimura K, et al. The intergenic spacer region of the ribosomal RNA gene of Penicillium marneffei shows almost no DNA sequence diversity[J]. Microbiol Immunol, 2010, 54(11): 714-716

[20] De Marco D, Perotti M, Ossi CM, et al. Development and validation of a molecular method for the diagnosis of medically important fungal infections[J]. New Microbiol, 2007, 30: 308-312

[21] Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 3505-3511